〔別紙２〕

審査の結果の要旨

氏名　　　伊藤　幸裕

タンパク質はあらゆる生命現象にとって重要な役割を担っており、タンパク質の異常はがんをはじめとする様々な疾患に関わる。従って、タンパク質を制御することはタンパク質の理解や疾患治療への期待が持てる。標的とするタンパク質量を制御する手法として遺伝子ノックアウトや遺伝子ノックダウンが頻繁に行われているが、これらはタンパク質の生成過程を阻害する遺伝学的な手法であり、すでに生成した（翻訳された）タンパク質量を制御することはできない。翻訳後の特定のタンパク質量を低分子化合物の処理で容易に制御可能となれば、その手法はタンパク質を知るためのツールとしてだけでなく、医薬への応用も期待できる。

伊藤幸裕は上述したような翻訳後タンパク質量制御法の確立を目指し、標的タンパク質を特異的に分解する手法であるプロテインノックダウン法の開発研究を遂行した。

１．開発戦略と作業仮説の実証研究

伊藤は inhibitor of apoptosis proteins (IAPs)のユビキチンリガーゼ活性と生理条件下における IAPs のカスパーゼ分解機構に着目し、標的タンパク質分解誘導剤（SNIPER）の設計とプロテインノックダウン法確立のための作業仮説を構築した。IAPs はユビキチンリガーゼ（E3）活性を有し、生体内において、カスパーゼと結合してそのユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導する（Figure 1A）[3]。すなわち、IAPs を認識する低分子化合物と標的とするタンパク質の特異的リガンドをリンカーで結んだ化合物は IAPs と標的タンパク質の人工的な複合体を形成し、生体内のカスパーゼ分解機構を模倣するように、標的タンパク質のユビキチン化と分解を誘導する可能性がある（Figure 1B）。

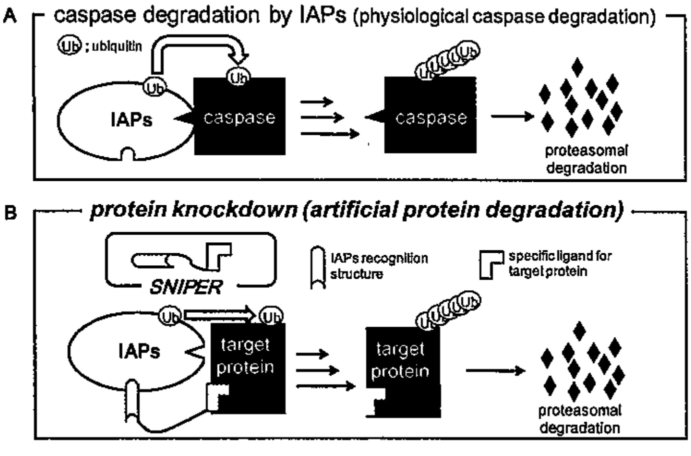

Figure 1. Physiological protein degradation and protein knockdown.

この作業仮説に基づき、IAPs の自己分解促進剤である MeBS と MV-1 の構造（Figure 2）を利用して cellular retinoic acid binding protein (CRABP)を標的とした SNIPER の創製研究を行った。CRABP の特異的リガンドのひとつである all-*trans* retinoic acid (ATAR, Figure 3)を用いて、分子設計、合成および活性評価を行った結果、二種類の CRABP SNIPER の創製に成功した（Figure 3)。

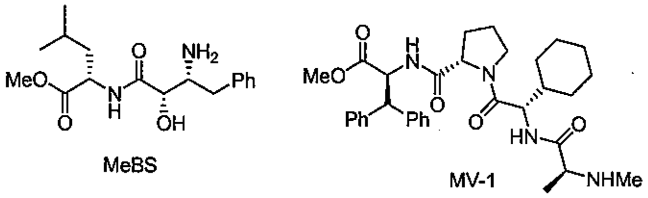

Figure 2. Structures of MeBS and MV-1.

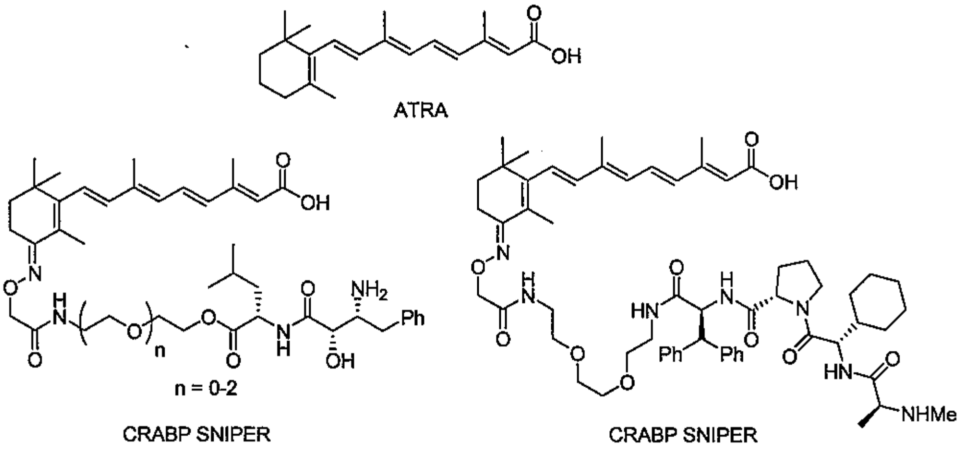

Figure 3. Structures of ATRA and two CRABP SNIPERs.

2．SNIPER の改良

上述した CRABP SNIPER は IAPs の自己分解促進剤である MeBS と MV-1 の構造を基に設計したため、IAPs の自己分解を促進してしまう。そこで、伊藤は標的タンパク質高選択的な SNIPER の創製を目指し更なる研究を行った。MeBS 類縁体の IAPs 自己分解促進活性における構造活性相関研究の再調査と更なる性質の検証を行ったところ、BE04 が IAPs に対して結合活性を有するが、IAPs 自己分解促進活性、IAPs 機能阻害活性および IAPs ユビキチンリガーゼ活性阻害活性を持たないという性質があることを見出した。そこで、この化合物を基に CRABP 高選択的な SNIPER の創製研究を行った結果、IAP 自己分解促進活性および IAP 機能阻害活性を持たない CRABP SNIPER を見出した（Figure 4)。加えて、BE04 および retinoic acid receptor (RAR)のリガンドの一つである Ch55 を基に、RAR を標的とした RAR SNIPER の創製にも成功した（Figure 4)。

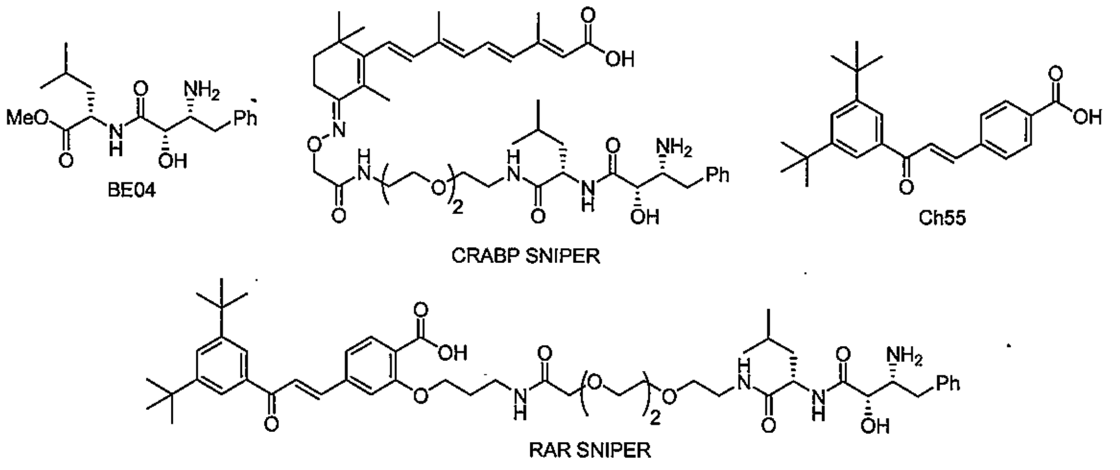

Figure 4. Structures of BE04, CRABP SNIPER, Ch55 and RAR SNIPER.

３．プロテインノックダウン法の応用研究

続いて、SNIPER を用いたプロテインノックダウン法を利用して、神経芽細胞腫細胞における CRABP-II 機能の解明研究を行った。その結果、CRABP SNIPER を用いて、(1) 神経芽細胞腫細胞において CRABP-II 分解がカスパーゼの活性化と細胞死促進を誘導すること、(2) IAP ファミリータンパク質のひとつである cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) の機能阻害と CRABP-II 機能阻害は、相乗的に神経芽細胞腫細胞の増殖を阻害すること、という 2 つの可能性を支持するデータが得られた。すなわち、SNIPER がケミカルバイオロジー研究に適応可能であることを示しただけでなく、創薬研究にも応用できることを示すことができたと言える。

以上のように、伊藤幸裕は合理的な戦略に基づき、プロテインノックダウン法の開発研究を行った。その結果、CRABP SNIPER および RAR SNIPER の創製に成功した。加えて、SNIPER を用いたプロテインノックダウン法がケミカルバイオロジー研究や創薬研究に応用できる可能性があることを実験的に証明した。これらの成果は、博士（薬学）の学位授与に値すると判断した。